



Amazônia Oriental  
Ministério da Agricultura e do Abastecimento  
Trav. Dr. Enéas Pinheiro s/n, Caixa Postal 48,  
Fax (91) 276-9845, Fone: (91) 276-6333,  
CEP 66.017-970 e-mail: cpatu@cpatu.embrapa.br

## PESQUISA EM ANDAMENTO

Pesqui. andam. Nº 9, Dezembro/99, p.1-3

### DEFINIÇÃO DE PROTOCOLO PARA ELETROFORESE DE ISOENZIMAS DE IPECACUANHA (*Psychotria ipecacuanha* Stokes) EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Maria Rosa Costa<sup>1</sup>  
Osmar Alves Lameira<sup>2</sup>  
Claud'ne do Socorro Mendes de Sousa<sup>3</sup>

A Ipecacuanha (*Psychotria ipecacuanha* Stokes) é uma planta medicinal da família Rubiaceae, conhecida vulgarmente por ipeca, sendo indicada no tratamento antidiarréico, amebicida, expectorante e antiinflamatório, tendo como princípio ativo a emetina.

Uma coleção desta espécie, com 72 acessos, está sendo mantida no Campo Experimental da Embrapa Amazônia Oriental, visando assegurar fontes de genes para utilização futura em programas de melhoramento genético e outras áreas afins, que são fundamentais para o desenvolvimento sustentável da agricultura e o sucesso da produção agrícola, além de prevenir a perda de valiosos recursos genéticos.

A caracterização molecular através das diversas técnicas de marcadores moleculares, hoje amplamente divulgadas, pode enriquecer e direcionar as informações no processo de conhecimento do germoplasma disponível, essencial para sua utilização em etapas subsequentes de programas de melhoramento genético de plantas. A conservação dos recursos genéticos disponíveis depende, fundamentalmente, do conhecimento e da quantificação da variabilidade genética que ocorre nas espécies.

Uma das maneiras de se caracterizar germoplasma é através da eletroforese de isoenzimas. Os marcadores bioquímicos, como as isoenzimas, examinadas por eletroforese, são mais sensíveis para estimar a variabilidade genética do que as características morfológicas, tendo em vista que sofrem menor influência ambiental (Pimentel, 1988). Segundo Cheliak & Pitel (1984), os marcadores isoenzimáticos normalmente não afetam as características fenotípicas adaptativas, ou seja, são

<sup>1</sup>Eng.-Agr., M.Sc., Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Caixa Postal 48, CEP 66017-970, Belém, PA.

<sup>2</sup>Eng.-Agr., Dr., Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental.

<sup>3</sup>Estagiária, Convênio UFPA/Embrapa Amazônia Oriental.



marcadores neutros que não estão sujeitos à seleção natural. Por isso, permitem a formulação de hipóteses relativas à quantidade, distribuição e manutenção da variabilidade genética em populações naturais ou artificiais.

A eletroforese é considerada uma técnica versátil para a análise de proteínas, sendo de fácil aplicação em estudos que abordam a variação genética presente nos organismos. Essa técnica, desenvolvida inicialmente por Kunkel e Teselius, no ano de 1951, e, mais tarde, aperfeiçoada com a introdução de uma camada suporte, de amido (Smithies, 1955), e de poliacrilamida (Ornstein & Davis, 1962, citados por Steward et al. (1965), consiste basicamente na migração diferencial de proteínas em campo elétrico, onde a velocidade de deslocamento das moléculas depende da carga elétrica líquida de sua superfície externa, seu tamanho, forma e a porosidade do meio suporte utilizado. Como isoenzimas são formas alternativas de uma molécula, pequenas mudanças na estrutura da proteína são detectadas por essa técnica (Hames, 1966).

Este trabalho está sendo desenvolvido no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia (seção de genética) da Embrapa Amazônia Oriental, com o objetivo de definir protocolo para eletroforese de isoenzimas de ipeca, identificando-se padrões enzimáticos com boa resolução, que permitam visualizar locus e alelos que possam ser utilizados como marcadores genéticos na caracterização genética de acessos de ipeca.

A extração de isoenzimas foi feita a partir de folhas jovens, coletadas no Banco de Germoplasma de Ipeca, que foram acondicionadas em sacos de plástico numerados, e colocadas em isopor com gelo para manter a temperatura baixa e evitar a desnaturação de enzimas. O extrato foi obtido triturando-se manualmente cerca de 50mg de tecido foliar, em almofariz e pistilo, com 1ml de tampão de extração e 70mg de pvpp (polivinilpolipirrolidona), sob nitrogênio líquido. Os extratos foram transferidos para os tubos de Eppendorf (1,5 ml), que foram submetidos à centrifugação (40 minutos em rotação de 15.000rpm a 4°C), para separação do extrato enzimático do precipitado vegetal. As amostras foram aplicadas nas canaletas do gel de poliacrilamida, e o aparato vertical (de duas placas) foi submetido à corrida eletroforética, sob condições de 16 a 30mA e 100 a 150 V, à temperatura de 4°C. Após a eletroforese, os géis foram removidos das placas e incubados em soluções específicas, contendo os substratos, coenzimas, soluções-tampão e sais necessários para a revelação das bandas. Os tampões de gel-eletródo e de coloração utilizados foram os descritos por Tsumura et al. 1990, modificados.

Foram testados os seguintes sistemas enzimáticos na ipeca: Diaforase (DIA), Malato Desidrogenase (MDH), Enzima Málica (ME), Glutamato Oxaloacetato Transaminase (GOT), Xiquimato Desidrogenase (SKDH), 6-fosfogluconato Desidrogenase (6PGDH), Glucose 6-fosfato Desidrogenase (G6PDH), Leucina Aminopeptidase (LAP), Glutamato Desidrogenase (GTDH), Tetrázólio Oxidase (TZO), Menadióna Redutase (MR), Sorbitol Desidrogenase (SDH), Fumarase (FUM), Aconitase (ACO), Fosfogluco Isomerase (PGI), Fosfatase Ácida (ACP), Fosfoglucomutase (PGM) e Aldolase (ALD).

Os resultados preliminares obtidos indicam que dos 18 sistemas investigados, dez apresentaram zimogramas de boa resolução (GOT, ACP, MNR, DIA, FUM, PGI, ADH, MDH, ME e GDH). Quanto ao restante, os sistemas SKDH, PGM, ACO e LAP não mostraram atividade em folhas de Ipeca, com o extrator testado.

Nos sistemas 6PGDH, SoDH, G6PDH e TZO, a resolução não foi satisfatória, ou seja, houve atividade, porém, formaram-se manchas difusas no gel, dificultando a visualização das bandas. Nestes sistemas estão sendo feitos ajustes no protocolo de extração e/ou coloração. Os sistemas GOT, ACP, MNR, DIA, FUM, PGI, ADH, MDH, ME e GDH, que apresentaram polimorfismo, serão utilizados como marcadores, na caracterização molecular desta espécie, que será a etapa subsequente deste trabalho.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHELIACK, W.M.; PITEL, J.A. Electrophoretic identification of clones in trembling aspen. **Canadian Journal of Forest Research**. v.14, p.740-743, 1984.
- HAMES, D.B. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: HAMES, D.B.; RICKWOOD, D., ed. **Gel electrophoresis of proteins: a practical approach**. 2. ed. New York: Oxford University Press, 1966. 139p.
- PIMENTEL, A.M. **Utilização da técnica da eletroforese em genética florestal**. Piracicaba: IPEF, 1988. 27p. (IPEF. Técnica, v.5, n.15).
- STEWART, F.C.; LYNDON, R.F.; BABER, J.T. Acrylamide gel electrophoresis of soluble plant proteins: a study on pea seedlings in relation to development. **American Journal of Botany**. v.52, n.2, p.155-164, 1965.
- TSUMURA, Y.; TOMARU, N.; SUYAMA, Y.; NAIM, M.; OHBA, K. Método de análise de isoenzimas. In: TSUKUBA, Universidade. **VI relatório sobre treinamento de estudos florestais**. Tsukuba, 1990. p.63-95 texto em Japonês.